

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
9. Oktober 2003 (09.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/083481 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 33/58**,  
33/543, C12Q 1/68

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/03163

(22) Internationales Anmeldedatum:  
27. März 2003 (27.03.2003)

**Erklärungen gemäß Regel 4.17:**

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AU, BR, BY, CA, CN, CO, IL, IN, IS, JP, KP, KR, MX, NO, NZ, PH, PL, RU, SG, TR, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR)

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 14 019.7 30. März 2002 (30.03.2002) DE

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(71) Anmelder und  
(72) Erfinder: **MÜLLER-SHULTE, Detlef, P.** [DE/DE]; Lüt-  
ticherstrasse 517b, 52074 Aachen (DE).

(74) Anwalt: **FLACCUS, Rolf-Dieter**; Bussardweg 10, 50389  
Wesseling (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, BR, BY, CA, CN,  
CO, IL, IN, IS, JP, KP, KR, MX, NO, NZ, PH, PL, RU, SG,  
TR, US, ZA.

(54) Title: LUMINESCENT, SPHEROID, NON-AUTOFLUORESCENT SILICA GEL PARTICLES HAVING VARIABLE EMIS-  
SION INTENSITIES AND FREQUENCIES

(54) Bezeichnung: LUMINESZIERENDE, SPHÄRISCHE, NICHT AUTOFLUORESZIERENDE SILICAGEL-PARTIKEL MIT  
VERÄNDERBAREN EMISSIONSINTENSITÄTEN UND -FREQUENZEN

(57) Abstract: The invention relates to spheroid, transparent silica gel particles that have a high luminescence generated by encapsulating one or more different luminescent substances in a silica gel matrix. The variation of the concentration of the luminescent substances and the encapsulation of substances having different emission frequencies permits the use of the inventive particles as multiplex coding or marker systems in bioanalytics and diagnostics.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft sphärische, transparente Silicagel-Partikel mit hoher Lumineszenz, die durch Einkapseln einer oder mehrerer verschiedener lumineszierender Substanzen in eine Silicagel-Matrix erzeugt wird. Durch Variation der Konzentration der lumineszierenden Substanzen sowie durch Einkapseln von Substanzen unterschiedlicher Emissionsfrequenz lassen sich die Partikel als multiplexe Kodierungs- bzw. Markersysteme in der Bioanalytik und der Diagnostik einsetzen.

WO 03/083481 A2

Lumineszierende, sphärische, nicht autofluoreszierende Silicagel-Partikel mit veränderbaren Emissionsintensitäten und -frequenzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft lumineszierende, sphärische Mikro- und Nanopartikel mit veränderbaren Lumineszenzintensitäten, ein Verfahren zu ihrer Herstellung sowie deren Verwendung.

Als Lumineszenz wird im folgenden die Emission von Licht des gesamten Spektralbereichs durch Stoffe definiert, die zuvor durch Energieabsorption angeregt wurden. Die Fluoreszenz und Phosphoreszenz fallen gleichfalls unter diesen Begriff.

Lumineszierende Stoffe werden heute in Form fluoreszierender oder phosphoreszierender Substanzen im gesamten Bereich der biochemischen und medizinischen Analytik bzw. Diagnostik routinemäßig zum Nachweis von Analyten wie Proteine, Peptide, Toxine oder Nukleinsäuren sowie als Marker zur Sichtbarmachung von Zellen, Zellkompartimenten oder zur Erfassung biologischer Prozesse eingesetzt.

Ein besonders interessante und zukunftssträchtige Nutzung der Lumineszenz-Methodik ergibt sich bei der sogenannten Array-Technik zum Nachweis von Biomolekülen. Unter Array-Technik versteht man im Bereich der heutigen Bioanalytik und Diagnostik flache Glas- oder Polymerträger bzw. Substrate - auch als Biochips bezeichnet -, auf denen in rasterartiger Anordnung eine Vielzahl von Biomolekülsonden (Nukleinsäuren, Proteine oder Peptide) bekannter Struktur aufgebracht sind. Durch Inkubation Lumineszenz-markierter Protein- bzw. Nukleinsäureproben, die zuvor z.B. aus Gewebe oder Zellen gewonnen wurden, mit dem Biochip kommt es an den Stellen auf seiner Oberfläche zu einer spezifischen Bindung, die ein zur Probe komplementäre chemisch-physikalische Struktur aufweist. Aufgrund der Lumineszenzmarkierung der Probe resultiert an der Bindungsstelle eine detek-

tierbare Lumineszenz, die eine direkte Information über die chemische und physikalische Struktur der Probe liefert. Infolge der hohen Anzahl der auf dem Chip immobilisierbaren Sonden stellt die Array-Technologie ein wertvolles Werkzeug auch für die Austestung von Molekülbibliotheken im Zuge der Pharmaka-Entwicklung dar.

Da die Qualität und die Anwendbarkeit der Chip-Technologie unmittelbar von der Nachweisempfindlichkeit sowie der spektralen Spezifität der Lumineszenzmarkers abhängt, wurden in der Vergangenheit vielfältige Entwicklungen in Richtung neuer, verbesserter Lumineszenzsysteme unternommen, um so die Nachweisgrenzen für den Bioassay entscheidend zu reduzieren.

Die Entwicklung lumineszierender Substanzen betrifft vorwiegend zwei Stoffklassen. Bei der einen handelt es sich um lumineszierende Moleküle, deren bekannteste Vertreter Fluorescein, Rhodamin, Phycoerythrin, Coumarin, Cy3, Cy5, TAM-RA, ROX, Oregon Green, Ethidiumbromid, Texas Red und Dabcyl sind (bei diesen Namen handelt es sich durchweg um Handelsnamen). Die andere Verbindungsklasse stellen die vornehmlich aus den Gruppen IIB und VIA, IIIA und VA oder IVA des Periodensystems gebildeten Halbleiter-Nanokristalle dar, deren bekannteste Vertreter CdS, CdSe, CdTe, ZnS und ZnSe sind. Ein besonderes Merkmal dieser Halbleiter-Nanokristalle ist zum einen die hohe Quantenausbeute, zum anderen neigen sie im Gegensatz zu den herkömmlichen Lumineszenzfarbstoffen praktisch nicht zum Ausbleichen. Ein weiterer bemerkenswerter Punkt, der die in der Literatur als „quantum dots“ bezeichneten Verbindungen zu einer interessanten Alternative zu den herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen hat werden lassen, ist die Umstand, daß das Absorptions- und Emissionsverhalten der quantum dots größenabhängig ist. D.h. konkret: mit abnehmender Teilchengröße verschiebt sich das Emissionsspektrum in den kürzerwelligen Bereich und umgekehrt.

Für die Entwicklung eines Bioassays unter Nutzung des Lumineszenzeffektes eröffnet das zusätzlich die Möglichkeit, unterschiedliche Lumineszenz-Markierungen nicht allein über die Substanzauswahl, sondern auch über die Teilchengröße vorzunehmen. Dies bietet eine hervorragende Basis zur optischen Kodierung von Biomolekülen im Rahmen der Bioarray-Entwicklung.

Die Verwendung von Fluoreszenzmarkern in der Bioanalytik ist vielfältig in der Literatur beschrieben.

US Patent 4,777,123 beschreibt ein Immunoassay-Prinzip, das die Verwendung von mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren markierten Rezeptoren offenbart, wobei der Energietransfer vom angeregten ersten Fluorophor auf den zweiten Fluorophor durch die Anwesenheit des zu detektierenden Liganden reduziert wird.

Gegenstand des US Patentes 5,324,633 sind Bioarray-Methoden zur Erfassung von an Biopolymeren gebundene Fluoreszenz-markierte Rezeptoren mit Hilfe eines Photonenzählers oder der konfokalen Mikroskopie.

Xanthen-Fluoreszenz-Farbstoffe mit einer Anregungsfrequenz von 450-650 nm zur Zell-Detektion mit Hilfe markierter Antikörper sind im US Patent 5,066,580 ausgeführt.

In den US Patenten 3,998,943, 3,996,345, 4,174,384, 4,199,559 und 4,261,968 werden Liganden-Rezeptorassays offenbart, deren Grundprinzip in der Markierung eines Rezeptors und/oder Liganden mit einem Fluoreszenzfarbstoff besteht, dessen Emissionsverhalten in Abhängigkeit von der Liganden-Rezeptorbindung detektiert wird.

Im US Patent 5,319,209 sind Fluoreszenz-Sonden u.a. in Form von Benzofuran-isophthalat offenbart, die zur Messung von Ionenkonzentrationen in Zellen geeignet sind.

Die Herstellung von Halbleiter-Nanokristallen bzw. quantum dots mit den entsprechenden optischen Eigenschaften ist allgemeiner Stand der Technik und in der Literatur divers beschrieben: Kortan et al., J. Am. Chem. Soc. Vol 112,

1327, 1990; Colvin et al., Nature, Vol. 370, 354, 1994; Murray et al., J. Am. Chem. Soc. Vol. 115, 8706, 1993; Hirai et al., J. Phys. Chem. B, Vol. 103, 4228, 1999; Dabousi et al., J. Phys. Chem. B, Vol. 101, 9463, 1997; Hines et al., J. Phys. Chem. Vol. 100, 468, 1996; Danek et al., Chem. Mater. Vol. 8, 173, 1996, Steigerwald et al., J. Am. Chem. Soc. (1988) 110: 3046-3050 und Lianos et al., Chem. Phys. Lett. Vol. 125, 299, 1986.

Für die Anwendung lumineszierender Substanzen in der Bioanalytik ist die eigentliche Synthese jedoch nicht allein ausschlaggebend, mitentscheidend ist parallel die Möglichkeit, die Lumineszenz-Marker an die entsprechenden Biosubstanzen kovalent zu binden. Bei Lumineszenzfarbstoffen werden funktionelle Gruppen vorwiegend in Form von N-Hydroxysuccinimidyl-Estern oder Isothiocyanat-Funktionen eingeführt, die mit den Aminogruppen der Biomoleküle eine Bindung eingehen.

Die Funktionalisierung der quantum dots geschieht dagegen grundsätzlich nach zwei Verfahrensweisen: zum einen werden die Oberflächen mit funktionellen Mercaptoverbindungen wie beispielsweise Mercaptopropionsäure, Dihydroliponsäure, Mercaptoessigsäure, Mercaptosilanen umgesetzt, die dann vorzugsweise über die Carboxylfunktion an die entsprechenden Biomoleküle gekoppelt werden (Gerion et al., J. Phys. Chem. Vol. 105, 8861, 2001; Mattoussi et al., J. Am. Chem. Soc. Vol. 122, 12142, 2000; Chan et al., Science Vol 281, 2016, 1998; Mitchell et al., J. Am. Chem. Soc. Vol. 121, 8122, 1999) oder die quantum dots werden in eine Polymermatrix oder Dendrimere eingekapselt („capping“). Lemon et al. (J. Am. Chem. Soc. Vol. 122, 12886, 2000), Sooklal et al. (Adv. Mater. Vol. 10, 1083, 1998) und Lakowicz et al. (J. Phys. Chem. Vol. 103, 7613, 1999) beschreiben die Einkapselung der Halbleiter-Nanokristalle mit Hilfe von Polyamidoamin-Dendrimeren. Einkapselungen unter Zuhilfenahme von Polystyrol-co-Vinylpyridin, Polystyrol, Silicagel oder Po-

lylaurylmethacrylat werden von Zhao et al. (Chem. Mater. Vol. 14, 1418, 2002), Han et al. (Nature Biotech., Vol. 19, 631, 2001), Correa-Duarte et al. (Chem. Phys. Letters, Vol. 286, 497, 1998), Chang et al. (J. Am. Chem. Soc. Vol. 116, 6739, 1994) und Lee et al. (Adv. Mater., Vol. 12, 1102, 2000) beschrieben.

Quantum dots, die mit Mercaptokomponenten und Diaminocarboxylsäuren umhüllt sind sowie Halbleiter-Nanokristalle, die in der Gasphase mit Hilfe eines Sprühsystems hergestellt werden, sind Gegenstand der US Patente 6,114,038 und 5,906,670.

Die Herstellung von Halbleiter-Nanokristalle aus der Gruppe III-V und II-VI, die zur Kopplung von Affinitäts-Liganden befähigt sind, gehen aus den US Patenten 6,207,397, 5,251,018, 5,751,018, 5,262,357 und 5,505,928 hervor. Gegenstand der US Patente 6,326,144 und 6,207,229 sind beschichtete Halbleiter-Nanokristalle mit einer Affinitätsbindung zu biologischen Komponenten bzw. monodisperse, mit ZnS, ZnSe, CdS oder CdSe beschichtete lichtemittierende Nanokristalle.

US Patente 5,293,050 und 5,354,707 offenbaren lichtemittierende Halbleiterschichten aus Silicon für Schaltkreise, in denen die zweite Silicon-Schicht mindestens einen quantum dot enthält.

In US Patent 5,525,377 werden 20 bis 100 Å große, mit Polymethylmethacrylaten beschichtete Nanopartikel aus dotierten Halbleiter-Verbindungen für den Einsatz als Kathodenstrahlröhren oder Elektrolumineszenz Displays beschrieben.

Die Verwendung von Halbleiter-Nanokristallen in Form von ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe; HgS, HgSe, HgTe, GaS, InAs, InP und InSb als Elektronen-Transportmedium zur Herstellung von Elektrolumineszenz-Geräten, die bei angelegter Spannung sichtbares Licht verschiedener Wellenlängen emittieren, gehen aus dem US Patent 5,537,000 hervor.

Mit Übergangsmetallen dotierte laserverstärkende Kristalle, bestehend aus Gruppe II und VI, sind Gegenstand des US Patentes 5,541,948.

Eine mit Lumineszenz-Nanokristallen dotierte Glasmatrix wird im US Patent 5,585,640 beschrieben. Zur Herstellung der dotierten vorgefertigten Glasformen werden Temperaturen über 1000 °C benötigt.

US Patent 5,770,299 offenbart Halbleiter-Nanokristalle bestehend aus CdS und/oder III-V Komponenten oder II-VI Halbleiter-Nanokristalle als Pigmente für Anstrichfarben. Eine Festphasen-Synthese von Fluoreszenz-markierten Peptid-Bibliotheken auf kommerziellen Silicagel-Beads werden im US Patent 5,789,162 beschrieben.

Lumineszenz-Halbleiter-Nanokristall-Sonden für biologische Applikationen, die mit Silanderivaten beschichtet und Affinitäts-Moleküle zu binden befähigt sind, sind im US Patent 5,990,479 ausgeführt.

US Patent 5,043,265 offenbart Fluoreszenz Partikel in Form von ZnS-Ag und  $Y_2O_3$ -Eu als Label für Immunglobuline und Polynukleotide.

Die Herstellung von Nanopartikeln aus Übergangsmetallen, Lanthaniden oder Actiniden in Gegenwart eines in einer inerten Gelpolymeren dispergierten, in Form von Nukleinsäure oder Proteinen vorliegenden Kationenaustauscher, ist Gegenstand des US Patents 5,985,353. Durch Zugabe entsprechender Anionen werden die an den Austauschern gebundenen Kationen zu Nanopartikeln ausgefällt.

Phycobiliprotein-Marker, die den Grad der spektralen Überlappung zwischen der Anregungs- und Emissionsfrequenz reduzieren können, entsprechend einer deutlichen Stokes-Verschiebung, sind im US Patent 4,666,862 sowie von Oi et al. (J. Cell. Biol. Vol. 93, 891 1982) beschrieben.

Eine weitere Gruppe lichtemittierender Substanzen stellen

die sogenannten up-converting phosphors dar, deren Besonderheit in der Emission kürzerwelliger Strahlung gegenüber der Anregungstrahlung besteht. Substanzen dieser Art setzen sich weitgehend aus Verbindungen des Sauerstoffs und/oder Schwefels und/oder Fluors mit den Lanthanoiden oder Yttrium zusammen.

Für die Verwendung im Bioassay haben diese Substanzen den Vorteil, daß ihre Absorptions- und Emissionsfrequenzen nicht durch Autofluoreszenz der Trägersysteme wie Trägerpartikel oder Mikrotiterplatten gestört werden, ein Phänomen, das in der heutigen Bioanalytik bei der Verwendung von Trägersystemen jedweder Art ein nach wie vor ungelöstes Problem darstellt.

In den US Patenten 5,674,698 und 5,698,397 sind eine Reihe von Molekül-Sonden in Form dotierter up-converting phosphore wie z.B. Na-Yttriumfluorid, Na-Yttriumfluorid, Lanthanfluorid, Gadoliniumfluorid und Yttriumoxysulfide beschrieben, die mittels Laseranregung in biologischen sowie anderen Assays genutzt werden.

In Polyacrylat-Mikroträgern eingekapselte up-converting phosphor Partikel, die für die Anregungs- und Emissionsfrequenzen transparent sind und über funktionelle Gruppen Protein-Sonden kovalent binden können, sind im US Patent 5,132,242 ausgeführt.

Up-converting phosphore für die Detektion von Nukleinsäuresequenzen bzw. für den Immunoassay sind von Corstjens et al. (Clin. Chem. Vol. 47, 1885, 2001) und Niedbala et al. (Anal. Biochem. Vol. 293, 22, 2001), Silan-beschichtete up-converting phosphore von Hampl et al. (Anal. Biochem. Vol. 288, 176, 2001) beschrieben.

Lumineszierende Metallporphyrine, die zur Detektion von biologischen Substanzen verwendet werden können, sind Gegenstand des US Patentes 6,004,530.



Die aus dem Stand der Technik bekannten Lumineszenzmarker in Form von Einzelmolekülen oder Nanokristallen haben den Nachteil, daß ihre Verwendung speziell für den Bioassay aufwendige Präparationen sowohl in bezug auf den zeitlichen als auch den verfahrenstechnischen Aufwand erfordern. So sind in der Regel Synthese- bzw. Präparationszeiten von mehreren Stunden bis hin zu mehreren Tagen (vgl. US Patent 5,132,242) in Verbindung mit aufwendigem verfahrenstechnischem Aufwand notwendig: Arbeiten unter Stickstoff-Inertgasatmosphäre, Destillationen, Arbeiten in organischen Medien. Darüber hinaus weisen die Produkte, sofern es sich um organische Polymere handelt, eine ausgeprägte Autofluoreszenz auf, vgl. Han et al., als Referenz oben aufgeführt. Die gravierendste Einschränkung der bekannten Lumineszenz Systeme ist, daß in der Regel jeweils nur ein oder sehr wenige Lumineszenz Partikel (Halbleiter-Nanokristalle oder up-converting phosphor Kristall) pro zu markierendem Biomolekül gebunden werden. Diese Beschränkung reduziert konsequenterweise die Nachweisempfindlichkeit des Bioassays nachhaltig. Ähnliches gilt auch für Lumineszenzmoleküle, von denen auch nur eine sehr geringe Zahl pro Biomolekül gebunden werden können, so dass das von einem markierten Biomolekül ausgehende Signal schwierig ist zu detektieren. Hinzu kommt, daß durch die Kopplung der lumineszierenden Substanz an das Biomolekül (z.B. Antikörper) dieses inaktiviert werden kann. Bei den alternativ dazu entwickelten Lumineszenz-markierten Mikro- oder Nanopartikeln handelt es sich jedoch durchweg um auf der Oberfläche der Partikel gebundene Lumineszenzmarker, deren Herstellung, Anwendung und Detektion schwierig ist; vgl.: Fornusek und Vetvicka, "Polymeric Microspheres as Diagnostic Tools for Cell Surface Marker Tracing," in CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 2, pp. 137-174, 1986. Der Artikel enthält eine kritische Übersicht über diese Technik, desweiteren, hier als Referenz angegeben: Kaplan et al. (Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 728, 112, 1983) sowie die

US Patente 3,853,987, 4,035,316, 4,105,598, 4,108,972, 4,224,198 und 4,326,008.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile der aus dem Stand der Technik bekannten Lumineszenz-Trägersysteme zu umgehen und lichtdurchlässige, nicht autofluoreszierende mikro- und submikropartikuläre Teilchen mit adaptierbarer Porosität bereitzustellen, die multiplexe lumineszierende Substanzen enthalten. Durch die Möglichkeit der Einkapselung einer Vielzahl lumineszierender Agenzien sowohl in Form von Molekülen als auch Nanopartikeln bzw. Kolloiden kann überraschenderweise die Nachweisempfindlichkeit für Biomoleküle im Rahmen der Bioanalytik und Diagnostik so gesteigert werden, daß die Möglichkeit zum Nachweis einzelner Moleküle möglich wird. Desweiteren kann durch die Einkapselung mehrerer Lumineszenz-Substanzen mit unterschiedlichem Emissionsverhalten eine Vielzahl optischer Kodierungen der Biomoleküle vorgenommen werden.

Diese Aufgabe wird gemäß der Erfindung durch Einkapseln lumineszierender Substanzen in eine lichtdurchlässige Matrix aus Silicagel ermöglicht, die die grundsätzlichen Lumineszenz-Eigenschaften der Basissubstanz nicht beeinträchtigen. Weiterhin wird diese Aufgabe gemäß der Erfindung durch ein inverses Suspensions-Verfahren gelöst, indem eine Mischung, bestehend aus einem Silicagel-Sol und der lumineszierenden Substanz, in einer mit Wasser nicht mischbaren organischen Phase dispergiert und anschließend polykondensiert wird. Dadurch werden dreidimensional vernetzte, perlförmige Polymerträger gebildet, die die Lumineszenz-Substanz eingekapselt enthält.

Silica-Sole werden nach den aus dem Stand der Technik allgemein bekannten Verfahren durch Hydrolyse von Alkoxysilanen mit Hilfe verdünnter Mineralsäuren (Dave et al. in: Immobilized Biomolecules in Analysis, Hrsg. Cass und Ligler, Oxford University Press, 1998; WO 02/09125 A1) hergestellt.

Als Alkoxysilane können Kieselsäureorthoester aliphatischer Alkohole eingesetzt werden, wobei bevorzugt Methyl-, Äthyl- oder Propylester einzeln oder als Mischungen verwendet werden. Zu dem Silica-Sol werden im zweiten Schritt die entsprechenden Lumineszenz-Substanzen zugegeben. Um das heterogene Sol-Lumineszenz-Substanz Gemisch homogener durchmischen zu können, wird die Reaktion in einem Ultraschallbad oder unter Zuhilfenahme einer Ultraschallsonotrode durchgeführt. Der Beschallungsvorgang dauert in der Regel eine halbe Minute. Die so gewonnene kolloiddisperse Mischung wird anschließend in einem organischen, nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel in der Regel unter Rühren dispergiert. Dabei werden perlförmige Sol-Tröpfchen gebildet, die durch anschließende Zugabe einer verdünnten Base zu dreidimensional vernetzten Silicagelen polykondensieren.

Die Polaritätseigenschaften des Sols und der organischen Dispersionsphase sind so gewählt, daß zum einen eine stabile Suspension gebildet wird, zum anderen die zugesetzte Lumineszenz-Substanz eine hohe Affinität zu der Sol-Phase besitzt, so dass eine klare Trennung zwischen Sol- und organischer Phase stattfindet und demzufolge sich die zugesetzte lumineszierende Verbindung ausschließlich in der Sol-Phase homogen verteilt.

Der gesamte Herstellungsprozess, einschließlich der Präparation der Silicagel-Sole, erfordert je nach Ansatz einen Zeitaufwand von 20 bis 50 Minuten.

Ausgangspunkt der Synthese der Lumineszenz-Partikel sind Silica-Sole, die nach bekannten Verfahren durch Hydrolyse geeigneter Alkoxysilane in saurem, wässrigem Milieu gebildet werden. Für das Verfahren und Produkt werden bevorzugt solche Silane eingesetzt, die einen C1 bis C3 Esterrest besitzen. Dies ermöglicht überraschenderweise zusammen mit einer definierten Konzentration der Silane die Herstellung vollkommen transparenter Partikel. Die Konzentrationen der Alkoxysilane im Anfangsansatz liegen zwischen 40 und 90 Vol%, vorzugsweise zwischen 65 und 80 Vol%. Durch Beschallen der

Silane in Gegenwart einer wäßrigen Säurelösung, deren Volumenanteil im Silanansatz in der Regel zwischen 10 und 40 Vol% und deren Konzentration in der Regel zwischen 0,01 und 0,5 Mol/Liter beträgt, werden klare Sole gebildet. Die Beschallungszeiten dauern je nach Säurekonzentration 5 bis 20 Minuten. Die so gewonnenen Silica-Sole lassen sich mehrere Tage bei Tieftemperaturen (ca.  $-18^{\circ}\text{C}$ ) aufbewahren oder können wahlweise sofort weiterverarbeitet werden.

Ein weiteres Merkmal der erfindungsgemäßen Silicagel-Technologie besteht darin, die Porosität der gewonnenen Partikel in weitem Rahmen zu variieren, ein Parameter, den kein anderes aus dem Stand der Technik bekanntes Verfahren in der Weise bietet.

Die Porosität von partikulären Trägermedien spielt bei sämtlichen Bioassays oder Separationsprozessen insofern eine entscheidende Rolle, als die spezifische Nachweisbarkeit des Analyten von dessen Anbindung an die auf dem Träger immobilisierten Liganden- bzw. Rezeptoren abhängt. Das Ausmaß und die Qualität dieses Bindungsprozesses wird direkt von der zugänglichen Oberfläche des Trägers beeinflusst. Letztere wird unmittelbar von der Porosität des Trägers bestimmt. Diese kann überraschenderweise mit Hilfe der erfindungsgemäßen Produkte und Verfahren über den Zusatz bestimmter Stoffe zu dem Sol eingestellt werden. Diese allgemein als Porogene bezeichneten Substanzen werden dem Sol vor der Dispersion zugegeben. Als Zusätze kommen bevorzugt solche Stoffe in Frage, die das Absorptions-Emissions-Verhalten der Träger nicht beeinträchtigen. Die Erfindung nicht einschränkende Beispiele hierfür sind: Polyethylenglykol, Polyvinylalkohol, Polyacrylsäure, Polyaminosäuren, Polysaccharide, Proteine oder Polyvinylpyrrolidon. Sie werden während des Dispersions- und Vernetzungsprozesses in die sphärischen Partikel eingekapselt. Der Volumenanteil der organischen Polymerlösungen, die durchweg als 1 bis 10%ige wäßrige Lösungen vorliegen, liegt zwischen 1 und 20 % bezogen auf die Sol-Phase.

Ein weiterer Parameter zur Einstellung der Porosität ergibt sich aus der Auswahl der Zusammensetzung der verschiedenen di- tri- oder tetrasubstituierten Silankomponenten. So weisen Gele aus rein tetrasubstituierten Estern grundsätzlich eine geringere Porosität auf als Sole bzw. Gele, die unter Zusatz von di- oder tri-substituierter Esterverbindungen hergestellt wurden. Durch gezieltes Zumischen der di- oder trifunktionellen Esterverbindungen lassen sich so Porenweiten im Bereich von 50-200 nm realisieren. Die Konzentration der di- und trifunktionellen Silane betragen in der Regel 1-10, vorzugsweise 1 bis 5 Vol%, bezogen auf die Gesamtsilankonzentration.

Ein weiterer, wesentlicher Aspekt der erfindungsgemäßen Produkte und Verfahren besteht darin, die Teilchengröße sowohl über die Art und Weise des mechanischen Rührens als auch über die Viskosität des Silica-Sols zu steuern. Bekannterweise werden die Teilchengrößen bei einer Suspensionspolymerisation über die Rührgeschwindigkeit eingestellt, derart, daß grundsätzlich mit zunehmender Rührgeschwindigkeit die Teilchengröße abnimmt. Der Zusammenhang dieser Parameter trifft auch bei der vorliegenden Erfindung zu, d.h., Rührgeschwindigkeiten >1000 U/Min. führen allgemein zu Teilchengrößen <50 µm, solche von >5000 U/Min. durchweg zu Teilchengrößen <10 µm. Zur Erzielung noch feinerer Partikel im submikrometer Bereich sind Dispergierwerkzeuge, die z.B. nach dem Rotor-Stator-Prinzip arbeiten und eine Rotorgeschwindigkeit von >10.000 U/Min. aufweisen (z.B. Ultra-Turrax®), erforderlich. Auch durch Behandlung mit Ultraschall lassen sich Teilchengrößen im Bereich von 0,5 bis 10 µm realisieren.

Neben der rein mechanischen Einflußgröße konnte gezeigt werden, daß auch die Viskosität des Sols einen entscheidenden Einfluß auf die Partikelgrößen hat. Sinkende Viskosität des Sols führt in der Regel zu einer analogen Verringerung

der Teilchengrößen und umgekehrt: steigende Viskositäten führen allgemein zu einer Teilchenvergrößerung. Die zur Herstellung der erfindungsgemäßen Produkte mit den gewünschten Partikelgrößen von 0,5 bis 50 µm erforderlichen Viskositäten liegen im Bereich von 5 bis 300 cp.

Nach der Präparation des Sols mit den gewünschten Eigenschaften wird im darauffolgenden Schritt der entsprechende Lumineszenzmarker zugesetzt und mit dem Sol innig vermischt, vorzugsweise unter Zuhilfenahme einer Ultraschall-Behandlung. Als lumineszierende Substanz kommen grundsätzlich solche Verbindungen in Frage, die nach Absorption von Strahlung einer bestimmten Wellenlänge zur Emission von Photonen einer von der Absorptionsfrequenz unterschiedlichen Frequenz befähigt ist und mit dem Silicagel-Sol eine homogene Mischung einzugehen in der Lage ist.

Substanzen dieser Art sind in der als Referenz aufgeführten Literatur vielfältig beschrieben. Die das erfindungsgemäße Produkt nicht einschränkende Beispiele für lumineszierende Moleküle bzw. Marker sind: Fluorescein, Rhodamin, Coumarin, Dansylchlorid, Ethidiumbromid, Texas Red, Phycoerythrin, Oregon Green oder Cascade Blue weiterhin die unter der Handelsbezeichnung BODIPY, SYBR Green, TOTO-1 oder YOYO-1 bekannten Verbindungen sowie die Derivate dieser Produkte. Als Halbleiter-Nanokristalle kommen Verbindungen aus der Reihe II-VI wie z.B. MgS, MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, BaTe, ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe, HgS, HgSe oder HgTe sowie Nanokristalle der Gruppe III-V wie GaAs, InGaAs, InP oder InAs in Frage. Desweiteren sind auch Halbleiter aus der Gruppe IVA wie z.B. Germanium geeignet.

Geeignete Beispiele für die up-converting phosphore sind Verbindungen aus Seltenen Erden oder Elementen der Gruppe IIIB wie: Na-Yttriumfluorid, Lanthanfluorid, Lanthanoxysulfid, Yttriumoxysulfid, Yttriumfluorid, Yttriumgallat, Gadoliniumfluorid, Barium-Yttriumfluoride, Gadoliniumoxysulfid

sowie mit Aktivatorpaaren wie Ytterbium/Erbium, Ytterbium/Thulium oder Ytterbium/Holmium dotierte Verbindungen des obigen Typs. Weiterhin als up-converting phosphore sind Chelat-Verbindungen aus Erbium, Neodym, Thulium, Holmium und Praseodym geeignet.

In analoger Weise lassen sich auch lumineszierende Proteine wie Rhodopsin, das grün-fluoreszierende Protein („green fluorescent protein“, GFP) sowie Metallporphyrine als Lumineszenz-Substanz einsetzen.

Die Konzentration der zugesetzten lumineszierenden Substanzen kann in weitem Rahmen variiert werden, je nach Erfordernis, die an die betreffende Bioanalytik oder Diagnostik gestellt ist. In der Regel reichen Konzentrationen von 1-10 Gew% der Markersubstanz aus, um eine deutliche Lumineszenz zu erzielen. Diese Konzentrationen übertreffen die bei den herkömmlichen Assays pro Analyt einsetzbaren Lumineszenzmarker-Konzentrationen um mehrere Zehnerpotenzen.

Aufgrund der hervorragenden Mischbarkeit der Silica-Sole mit den verschiedensten Substanzen, hat sich überraschenderweise die Möglichkeit ergeben, zusätzlich zu den Lumineszenz-Substanzen simultan auch magnetische Verbindungen in Form magnetischer Kolloide bzw. Nanopartikel miteinzukapseln. Dies ermöglicht eine völlig neuartige Eigenschaftskombination, die die parallele Nutzung des Lumineszenzeffektes und der magnetischen Abtrennung eröffnet. Hieraus ergeben sich völlig neue Perspektiven für die Entwicklung hocheffizienter Bioarrays, mit denen eine sehr hohe Zahl von Biomolekülen („Molekül-Bibliothek“) ausgetestet werden kann, die den bisherigen, ausschließlich auf Polymer- oder Glassubstraten durchgeführten Arrays verschlossen bleibt.

Als magnetische Substanzen kommen durchweg die bekannten ferro-, ferri- oder superparamagnetischen Substanzen sowie Ferrofluide in Frage, die in der einschlägigen Literatur

vielfach beschrieben sind: Br. Patent 1 439 031, Shinkai et al., Biocatalysis Vol 5, 61, 1991, Kondo et al., Appl. Microbiol. Biotechn. Vol. 41, 99, 1994.

Die Konzentrationen der Magnetkolloide werden durchweg so gewählt, daß die Transparenz der Partikel im Hinblick auf das Absorptions- und Emissionsverhalten der Lumineszenzmarker grundsätzlich nicht beeinträchtigt ist. Sie liegen in der Regel zwischen 10 und 30 Gew% bezogen auf die Silicagel-Partikel.

Im dritten Verfahrensschritt werden die Silicagel-Lumineszenzmarker-Mischungen in einer organischen Phase unter Rühren dispergiert. Als Dispergiermittel sind solche Lösungsmittel geeignet, die mit Wasser nicht-mischbar sind und eine stabile Dispersion des Silica-Sols erlauben.

Dispersionsmittel dieser Art sind aus dem Stand der Technik allgemein bekannt und in WO 02/09125 sowie von Laane et al. („Biocatalysis in Organic Media“, Laane et al. Hrsg., Elsevier, Amsterdam, pp 65, 1987) beschrieben. Lösemittel, die diese Eigenschaften erfüllen, sind z.B. Hexan, Trichloräthylen, Petroläther, Toluol, Chloroform, 1.1.1-Trichloräthan, Tetrachlorkohlenstoff, Heptan. Auch Mischungen der obigen Lösungsmittel, die eine Dichte von ca. 1 g/cm<sup>3</sup> aufweisen, eignen sich gut zum Dispergieren. Die Volumenverhältnisse organische Phase zu Hydrosol betragen in der Regel 8:1 bis 30:1.

Im Hinblick auf eine engere Größenverteilung der Partikel und auf ein besseres Dispergierverhalten können der organischen Phase eine oder mehrere oberflächenaktive Substanzen in Form von Tensiden, Dispersionsstabilisatoren oder Emulgatoren zugesetzt werden. Beispiele hierfür sind: Propylenoxid-Äthylenoxid-Blockcopolymere, Polyhydroxyfettsäure-Polyäthylenglykol-Blockcopolymere, Polyäthylenglykol-Ätherderivate, Sorbitan-Fettsäureester, Blockcopolymere aus Rizinusöl-Derivaten, Polyäthylenglykol-Castoröl-Derivate, Po-



lyoxyäthylen-Sorbitan-Fettsäureester, Alkylphenylpolyäthylenglykol-Derivate, Polyglycerinester, modifizierte Polyester, Polyoxypropylen-Äthylendiamin-Blockcopolymere, Polyäthylenglykole, Polyoxyäthylen-, Polyoxyäthylen-Alkohol-Derivate. Substanzen dieser Art sind im Handel u.a. unter der Handelsbezeichnung: Renex®, Estol®, Prisorine®, Hypermer®, Pluronic®, Tween®, Eumulgin®, Pripol®, Tetronic®, Brij®, Lameform®, Arlacel®, Span®, Dehymuls®, Synperonic® oder Triton® bekannt. Die für die Herstellung der Partikel relevanten Tensid-Konzentrationen liegen zwischen 0,1 und 15%, vorzugsweise zwischen 0,5 und 6 Vol- bzw. Gew%.

Im letzten Verfahrensschritt werden die Sole während des Dispergiervorganges mit einer verdünnten Base versetzt, wodurch erstere zu einem festen Gel polykondensieren. Die Fixierung der Sole zu den gewünschten Gel-Partikeln geschieht in der Regel innerhalb weniger Sekunden (3 bis 20 Sekunden). Dementsprechend erfordert der mechanische Dispergiervorgang auch nur wenige Sekunden. Der Gelbildungs- sowie der parallele mechanische Dispergierprozess ist dabei um so kürzer, je höher die gewählte Basenkonzentration ist. Als Base wird vorzugsweise Ammoniak in Form einer 1 bis 12%igen wäßrigen Lösung verwendet, andere Basen, wie z.B. NaOH, Diäthylamin oder KOH, können grundsätzlich auch eingesetzt werden. Die Volumenverhältnisse Base zu Sol liegen üblicherweise zwischen 1:2 und 1:4.

Infolge der äußerst rasch verlaufenden Gelierungsreaktion wird der gesamte Partikel-Herstellungsprozess einschließlich der Einkapselung der Lumineszenzmarker innerhalb von einer Stunde bewerkstelligt. Dies stellt gegenüber allen herkömmlichen Verfahren zur Herstellung lumineszierender Partikel eine Zeitersparnis von bis zu 90% dar.

Dem Herstellungsprozess schließen sich mehrere Waschungen mit Alkohol und Wasser an. Die erhaltenen Magnetträger wer-

den üblicherweise in Wasser aufbewahrt. Danach können die gewonnenen Silicagel-Partikel direkt zur weiteren Funktionalisierung herangezogen werden.

Zur Ankopplung der Lumineszenz Partikel an die entsprechenden Biomoleküle wie Proteine, Antikörper, Peptide, Enzyme, Nukleinsäuren, Oligosaccharide, die durchweg als Zielsubstanzen, Rezeptoren, Bioliganden oder Analyt-Sonden fungieren, werden die hinlänglich bekannten Aktivierungs- und Kopplungsverfahren für Silicagel- bzw. silanisierte Träger verwandt. Dazu gehören die Umsetzungen mit funktionellen Alkoxysilanen, die z.B. über Amino-, Epoxy-, Mercapto-, Isothiocyanat-, Acryl- oder Halogen-Gruppen verfügen. Beispiele für solche Aktivierungs- bzw. Kopplungsagenzien sind: 3-Aminopropyl-triethoxysilan, 3-Aminopropyltrimethoxysilan, 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan, 3-Glycidyloxypropylmethyl-diethoxysilan, 3-Mercaptopropyl-trimethoxysilan, 3-Isothiocyanatopropyl-triethoxysilan, Methacryloxypropyl-triethoxysilan, Chlorpropyl-triethoxysilan. Auch die Einführung von Carboxyl-, Hydroxyl oder Aldehyd-Gruppen über eine entsprechende Derivatisierung der obigen Alkoxysilane z.B. mit Aminocarbonsäuren, Glutardialdehyd oder Hydrolyse der Epoxy-Gruppen mit Säuren oder Basen zum Hydroxy-Derivat ist allgemein aus dem Stand der Technik bekannt. Ebenso führt die Umsetzung der Epoxy-aktivierten Träger u.a. mit Carbonsäuren, Sulfiten, Thiosulfaten, Amino-substituierten Carbonsäuren wie z.B. Nitrilotriessigsäure oder Iminodisessigsäure nach den bekannten Verfahren zu einem Metallchelat-Träger. Auch die Aktivierung der Silicagel-Partikel über photoaktive, beispielsweise Arylazid- oder Diazirinfunktionen-tragende Agenzien, die durch UV-Bestrahlung zunächst an den Träger gekoppelt und anschließend mit dem Bioliganden bzw. dem Biomolekül abreagieren können, sind ebenfalls in einfacher Weise durchführbar. Substanzen dieser Art sind z.B.: N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidobenzoat, [2-Nitro-4-[3-(trifluormethyl)-3H-diazirin-3-

yl]phenoxy]acetyl-N-hydroxysuccinimidat, N-Hydroxysuccinimidyl-(4-azidophenyl)-1,3'-dithiopropionat, N-[m-[3-(trifluormethyl)diazirin-3-yl]phenyl]-4-maleimidobutyramid. Auf eine detaillierte Beschreibung der verschiedenen Aktivierungen, Funktionalisierungen sowie Kopplungen kann an dieser Stelle verzichtet werden, da die speziellen Reaktionsmethoden allgemein bekannt sind und von einem Fachmann auf diesem Gebiet jeder Zeit genutzt werden können (vgl. Vansant et al., in: „Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface“, Hrsg. Delmon und Yates, Elsevier, Amsterdam, 1997; „Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers“, Häfeli et al. (Hrsg.), Plenum Press, New York, 1997; Shriver-Lake in: „Immobilized Biomolecules in Analysis“, Cass und Ligler Hrsg., Oxford University Press, 1998; WO 99/01766; Lottspeich und Zorbas Hrsg., in: „Bioanalytik“, Spektrum Verlag, Heidelberg, 1998). Die erwähnten prinzipiellen Ausführungsformen sind daher in keiner Weise als limitierende Offenbarungen aufzufassen.

Die Anwendung der erfindungsgemäßen Lumineszenz-Partikel erstreckt sich auf sämtliche Gebiete der Bioanalytik und Diagnostik, die zum Nachweis oder Quantifizierung spezifischer Substanzen bzw. Analyten eine Farbreaktion, die Lumineszenz oder Radioaktivität nutzen. Beispiele hierfür sind der Immunoassay in Form des Radio- oder des Enzymimmunoassays, der Nukleinsäurenachweis, die Proteomanalyse, die DNA-Sequenzierung, der Phage-Display, die Zellmarkierung, der Nukleinsäure-Array oder die Zellmarkierung. Ferner lassen sich die partikulären Lumineszenzmarker in der Durchflußcytometrie bzw. im fluoreszenzaktivierten Zellsorter (fluorescence-activated cell sorter, FACS®) oder beim Durchtesten von DNA- oder Protein-Bibliotheken einsetzen.

In den nachfolgenden Beispielen werden die erfindungsgemäßen Produkte und Verfahren näher beschrieben, ohne diese zu begrenzen.

#### Beispiel 1

5 ml Tetramethoxysilan werden zusammen mit 2 ml 0,05 M HCl in einem Ultraschallbad für 10 Minuten bei Raumtemperatur beschallt. 2 ml des gewonnenen klaren Sols werden mit 1 ml 0,05 %iger Rhodamin B-Lösung versetzt. Die erhaltene Mischung wird in 25 ml 0,4 ml Korantin (BASF) enthaltendem Hexan eingetragen. Der Ansatz wird mit einem Dispergierwerkzeug (Ultra-Turrax) für 3 Sekunden bei 20.000 U/min. dispergiert. Nach erfolgter Zugabe von 1 ml 1%ige Ammoniak-Lösung wird noch 5 Sekunden weiter dispergiert. Nach weiteren 5 Minuten werden die Teilchen mittels zweiminütiger Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wird abdekantiert und je dreimal mit je ca. 10 ml Ethanol, Aceton und Wasser nachgewaschen. Es werden Lumineszenzpartikel mit einer Teilchengröße von 1-3 µm gewonnen.

Die gewonnen Teilchen werden anschließend mehrfach mit wasserfreiem Toluol gewaschen und anschließend unter Argonatmosphäre mit 5 ml wasserfreiem Toluol und 2 ml 3-Glycidyl-oxypropyl-trimethoxysilan 3 Stunden bei 90°C unter Rühren umgesetzt. Danach wird fünfmal mit Toluol und Aceton nachgewaschen.

100 mg des gewonnenen Produktes werden sodann dreimal mit 0,5 molarem Phosphat-Puffer, pH 8,5, gewaschen und anschließend mit 2 ml desselben Puffers, in dem 10 mg Streptavidin gelöst sind, bei 40°C 5 Stunden inkubiert. Das Produkt wird anschließend fünfmal unter Anwendung eines jeweiligen Zentrifugationsschrittes mit 0,05 M Phosphat-Puffer, pH 7,2 gewaschen. Zur Blockierung restlicher Epoxy-Gruppen wird das gekoppelte Produkt 24 Stunden in 1%iger Äthanolamin-Lösung, die 0,1% Serum Albumin enthält, bei Raumtempe-

ratur aufbewahrt. Danach erfolgt mehrfaches Waschen mit 0,05 Tris/HCl-Puffer, pH 8,0.

Es resultiert ein Produkt, das zur Bindung bzw. Markierung biotinylierter Biomoleküle eingesetzt werden kann.

## Beispiel 2

2 ml des analog Beispiel 1 hergestellten Silica-Sols, werden mit 10 mg nach einer Vorschrift von Sooklal et al. (Adv. Mater., Vol. 10, 1083, 1998) synthetisierten CdS-Halbleiter-Nanokristallen, die eine mittlere Teilchengröße von 138 nm aufweisen, vermischt und anschließend 2 Min. bei Raumtemperatur beschallt. Die Mischung wird in 25 ml Toluol, das je 2,5 Vol% Span 60 und 0,5Vol% Tween 80 gelöst enthält, mit Hilfe eines Ultra-Turrax bei 20.000 U/min. 5 Sekunden dispergiert. Nach Zugabe von 1 ml 6%iger Ammoniak-Lösung wird noch 5 Sekunden weiter dispergiert. Es folgt die Separation und Aufarbeitung der Partikel analog Beispiel 1. Es werden Lumineszenzpartikel mit einer mittleren Teilchengröße von 3,6 µm gewonnen, deren Emissionsmaximum bei 510 nm liegt.

Zur Aktivierung der Teilchen werden 75 mg Lumineszenzpartikel in Gegenwart von [2-Nitro-4-[3-(trifluormethyl)-3H-diazirin-3-yl]phenoxy]acetyl-N-hydroxysuccinimidat (Ansatz: 5 mg gelöst in 0,5 ml Ethanol-Wasser (1:1)), mit Hilfe des Stratalinker UV 2400 (Stratagene) für 20 Minuten bestrahlt. An das aktivierte Produkt können nach entsprechendem Waschvorgang mit Äthanol und Wasser Aminogruppen-haltige Biomoleküle, Liganden oder Rezeptoren wie Nukleinsäuren, Proteine oder Antikörper nach den bekannten Methoden (Matson und Little, J. Chromatogr., Vol. 458, 67, 1988) gekoppelt werden.

### Beispiel 3

0,5 ml Tetraethoxysilan werden mit 0,1 ml Wasser und 0,08 ml 0,1 M HCl vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur in einem Ultraschallbad beschallt. 0,2 ml des gewonnenen Sols werden mit 5 mg  $(\text{YYbEr})_2\text{O}_3\text{S}$ , das nach einer Vorschrift von Hampf et al. (Anal. Biochem., Vol. 288, 176, 2001) hergestellt wurde, vermischt und 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Der Mischung werden sodann 30 mg Magnetit-Pulver (Bayferrox 318M, Fa. Bayer, FRG) zugesetzt. Die Mischung wird nochmals für 2 Minuten beschallt. Die Mischung wird anschließend unter Rühren (Ultra-Turrax) bei 12.000 U/min in 3 ml Trichlorethylen, in dem 2 Vol% Dehymuls HRE7<sup>®</sup> und 0,5 Vol% Prisorine 3700<sup>®</sup> gelöst sind, dispergiert. Während des Dispergiervorganges werden 0,08 ml 6%ige wäßrige Ammoniaklösung zugefügt. Es wird noch weitere 5 Sekunden weitergerührt. Separation und Aufarbeitung der gewonnenen Lumineszenzpartikel erfolgt analog Beispiel 1.

Man erhält Lumineszenzpartikel mit einer mittleren Größe von 6,7  $\mu\text{m}$ .

Das 3 Stunden im Vakuum getrocknete Produkt wird fünfmal mit getrocknetem Toluol nach jeweiliger magnetischer Abtrennung gewaschen und anschließend 12 Std. nach Zugabe von 3 ml Toluol und 0,25 ml 3-Aminopropyltriäthoxysilan am Rückfluß gekocht. Die Magnetpartikel werden wieder magnetisch abgetrennt und mit ca. 5 ml Toluol und Chloroform 3-mal gewaschen. Es folgt eine mehrstündige Trocknung im Vakuum. Das aminomodifizierte Produkt wird anschließend mit 6%iger Glutaraldehyd-Lösung in 4 ml 0,1 M Na-Carbonat-Puffer, pH 9.0, für 2 Std. bei 35°C umgesetzt. Es wird anschließend mit 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7.2, intensiv nachgewaschen.

An die gewonnenen Aldehyd-funktionalisierten Lumineszenzpartikel können anschließend nach den bekannten Verfahren Aminogruppen-tragende Biomoleküle wie Proteine, Peptide

oder am 5'-Ende mit Aminogruppen-substituierte Nukleinsäuren oder Oligonucleotide nach den bekannten Verfahren gekoppelt werden. Die so funktionalisierten Lumineszenzpartikel lassen sich als Sonden in Protein-oder Nukleinsäure-Arrays einsetzen.

### Ansprüche

1. Lumineszierende Silicagel-Partikel, die in einer transparenten Silicagel-Matrix eine oder mehrere lumineszierende Substanzen enthalten.
2. Partikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie keine Eigenfluoreszenz aufweisen.
3. Partikel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte(n) lumineszierende(n) Substanz(en) in die Partikel eingekapselt sind.
4. Partikel nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die lumineszierende(n) Substanz(en) aus der Gruppe der Substanzen ausgewählt ist/sind, die eine Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Chemilumineszenz, Elektrolumineszenz oder einen Lumineszenz-Energietransfer aufweisen.
5. Partikel nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der lumineszierenden Substanzen 1 bis 10 Gew.-% beträgt.
6. Partikel nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die lumineszierenden Substanzen unterschiedliche Emissionsfrequenzen aufweisen.
7. Partikel nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die lumineszierenden Substanzen Moleküle sind, deren Anregungsfrequenz höher ist als die Emissionsfrequenz.
8. Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die lumineszierenden Substanzen aus Halbleiter-Nanokristallen bestehen, die aus Elementen der Gruppe IIIA und VA, Gruppe IIB und VIA oder Gruppe IVA gebildet sind.



9. Partikel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die lumineszierenden Halbleiter-Nanokristalle mit Kupfer- und/oder Silberzusätzen dotiert sind.
10. Partikel nach einem Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die lumineszierenden Substanzen Anregungsfrequenzen aufweisen, die niedriger als die Emissionsfrequenzen sind.
11. Partikel nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die lumineszierenden Substanzen mikrokristalline Verbindungen aus Seltenen Erden und/oder Yttrium mit Elementen aus der Gruppe VIA und/oder VIIA sind.
12. Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die lumineszierenden Substanzen Metall-Chelatverbindungen sind, deren Zentralatom aus der Gruppe VIII, IB, IIB oder der Gruppe der Seltenen Erden ausgewählt ist.
13. Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die lumineszierenden Substanzen Pyrrolfarbstoffe sind.
14. Partikel nach Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die lumineszierenden Substanzen lumineszierende Proteine sind.
15. Lumineszierende Polymerpartikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, in welchen zusätzlich ein magnetisches Kolloid enthalten oder miteingekapselt ist.
16. Partikel nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das magnetische Kolloid aus der Gruppe ausgewählt ist, die ferro-, ferri- und superparamagnetische Verbindungen und Ferrofluide umfaßt.
17. Partikel nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß das magnetische Kolloid in einer Konzentration von 10-50 Gew%, bezogen auf das Polymerpartikel, vorliegt.

18. Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Silicagele funktionelle Gruppen aufweisen, die mit Biomolekülen, ausgewählt aus der Proteine, Peptide, Zellrezeptoren, Nukleinsäuren, Nukleinsäure-Fragmente, Polysaccharide, Oligosaccharide, Antikörper, Antikörper-Fragmente, Streptavidin, Avidin, Biotin und Enzyme umfassenden Gruppe, koppelbar sind, oder an die eine oder mehrere solcher Biomoleküle gekoppelt sind.

19. Verfahren zur Herstellung lumineszierender Silicagel-Partikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) eine Mischung bestehend aus einer verdünnten Säure und Alkoxysilanen zu einem klaren Silica-Sol kondensiert wird,
- b) das klare Silica-Sol mit einem oder mehreren lumineszierenden Substanzen homogen vermischt wird,
- c) die Sol-Lumineszenz-Substanz-Mischung in einer mit Wasser nicht mischbaren organischen Phase dispergiert und
- d) die Sol-Lumineszenz-Substanz-Mischung während oder nach dem Dispergiervorgang durch Zugabe einer Base vernetzt wird.

20. Verfahren zur Herstellung lumineszierender, transparenter Silicagel-Partikel gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Sol-Lumineszenz-Substanz-Mischung 10-50 Gew% einer ferro-, ferri- oder superparamagnetischen Substanz zugesetzt werden.

21. Verfahren zur Herstellung lumineszierender Silicagel-Partikel gemäß Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß die mit Wasser nicht mischbare organische Phase eine oder mehrere oberflächenaktive Substanz(en) in einer Konzentration von 0,1 bis 15 Vol% enthält.

22. Verfahren zur Herstellung lumineszierender Silicagel-Partikel gemäß einem der Ansprüche 19 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Volumenverhältnis Sol zu organischer Phase 1:5 bis 1:30 beträgt.

23. Verfahren zur Herstellung lumineszierender Silicagel-Partikel gemäß einem der Ansprüche 19 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Dispersions-Vernetzungsvorgang 2 bis 30 Sekunden dauert.

24. Verfahren zur Herstellung lumineszierender Silicagel-Partikel gemäß einem der Ansprüche 19 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß dem Sol vor dem Dispergiervorgang 1- 20 Vol% einer wäßrigen Lösung eines organischen Polymeren, Polysaccharids oder Proteins zugemischt werden.

25. Verwendung der lumineszierenden Silicagel-Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 18 für die Analyse und/oder Diagnostik von Nukleinsäuren, Nukleinsäure-Fragmenten, Proteinen, Peptiden, Antikörpern, Antikörper-Fragmenten, Zellen, Zellrezeptoren, biotinylierten Biomolekülen sowie für die Durchtestung von Protein- oder Nukleinsäure-Bibliotheken, als Sonden im Rahmen der Array-Technologie oder für die Nukleinsäure-Sequenzierung.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
9. Oktober 2003 (09.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2003/083481 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/58,  
33/543, C12Q 1/68, C09K 11/02

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/003163

(22) Internationales Anmeldedatum:  
27. März 2003 (27.03.2003)

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AU, BR, BY, CA, CN, CO, IL, IN, IS, JP, KP, KR, MX, NO, NZ, PH, PL, RU, SG, TR, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 14 019.7 30. März 2002 (30.03.2002) DE

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: MÜLLER-SCHULTE, Detlef, P. [DE/DE];  
Martelenberger Weg 8, 52066 Aachen (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(74) Anwalt: FLACCUS, Rolf-Dieter; Bussardweg 10, 50389  
Wesseling (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 25. März 2004

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, BR, BY, CA, CN, CO, IL, IN, IS, JP, KP, KR, MX, NO, NZ, PH, PL, RU, SG, TR, US, ZA.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: LUMINESCENT, SPHEROID, NON-AUTOFLUORESCENT SILICA GEL PARTICLES HAVING VARIABLE EMISSION INTENSITIES AND FREQUENCIES

(54) Bezeichnung: LUMINESZIERENDE, SPHÄRISCHE, NICHT AUTOFLUORESZIERENDE SILICAGEL-PARTIKEL MIT VERÄNDERBAREN EMISSIONSINTENSITÄTEN UND -FREQUENZEN

(57) Abstract: The invention relates to spheroid, transparent silica gel particles that have a high luminescence generated by encapsulating one or more different luminescent substances in a silica gel matrix. The variation of the concentration of the luminescent substances and the encapsulation of substances having different emission frequencies permits the use of the inventive particles as multiplex coding or marker systems in bioanalytics and diagnostics.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft sphärische, transparente Silicagel-Partikel mit hoher Lumineszenz, die durch Einkapseln einer oder mehrerer verschiedener lumineszierender Substanzen in eine Silicagel-Matrix erzeugt wird. Durch Variation der Konzentration der lumineszierenden Substanzen sowie durch Einkapseln von Substanzen unterschiedlicher Emissionsfrequenz lassen sich die Partikel als multiplexe Kodierungs- bzw. Markersysteme in der Bioanalytik und der Diagnostik einsetzen.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/03163

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/58 G01N33/543 C12Q1/68 C09K11/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 24 26 919 A (GRAVISSE PHILIPPE EDOUARD JEAN) 2 January 1976 (1976-01-02) siehe Ansprüche ---	1-5
Y	CHANG SONG-YUAN ET AL: "Preparation and Properties of Tailored Morphology, Monodisperse Colloidal Silica-Cadmium Sulfide Nanocomposites" J. AM. CHEM. SOC., vol. 116, no. 15, 1994, pages 6739-6744, XP001154849 siehe Abstrakt und Conclusion --- -/--	1-18



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 October 2003

Date of mailing of the international search report

23/10/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Grosskopf, R

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/03163

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CORREA-DUARTE MA ET AL: "Stabilization of CdS semiconductor nanoparticles against photodegradation by a silica coating procedure" CHEMICAL PHYSICS LETTERS, vol. 286, 17 April 1998 (1998-04-17), page 497-501 XP002256994 siehe das ganze Dokument -----	1-18
A	US 5 585 640 A (HUSTON ALAN L ET AL) 17 December 1996 (1996-12-17) -----	
A	US 5 789 162 A (GALLOP MARK A ET AL) 4 August 1998 (1998-08-04) -----	
A	CHAN WARREN C W ET AL: "Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, vol. 13, no. 1, February 2002 (2002-02), pages 40-46, XP002256995 ISSN: 0958-1669 -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/03163

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 2426919	A	02-01-1976	DE 2426919 A1	02-01-1976
US 5585640	A	17-12-1996	AT 210307 T	15-12-2001
			CA 2213477 A1	18-07-1996
			DE 69524458 D1	17-01-2002
			DE 69524458 T2	01-08-2002
			EP 0871900 A1	21-10-1998
			JP 11502610 T	02-03-1999
			WO 9621868 A1	18-07-1996
US 5789162	A	04-08-1998	US 6165717 A	26-12-2000
			AT 148889 T	15-02-1997
			AU 669489 B2	13-06-1996
			AU 2661992 A	27-04-1993
			CA 2118806 A1	01-04-1993
			DE 69217497 D1	27-03-1997
			DE 69217497 T2	12-06-1997
			DK 604552 T3	04-08-1997
			EP 0604552 A1	06-07-1994
			EP 0773227 A1	14-05-1997
			ES 2097925 T3	16-04-1997
			GR 3023156 T3	30-07-1997
			JP 2001524926 T	04-12-2001
			US 6143497 A	07-11-2000
			WO 9306121 A1	01-04-1993
			US 5639603 A	17-06-1997
			US 6140493 A	31-10-2000
			US 6416949 B1	09-07-2002
			US 5708153 A	13-01-1998
			US 5770358 A	23-06-1998

# INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03163

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 G01N33/58 G01N33/543 C12Q1/68 C09K11/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 24 26 919 A (GRAVISSE PHILIPPE EDOUARD JEAN) 2. Januar 1976 (1976-01-02) siehe Ansprüche	1-5
Y	CHANG SONG-YUAN ET AL: "Preparation and Properties of Tailored Morphology, Monodisperse Colloidal Silica-Cadmium Sulfide Nanocomposites" J. AM. CHEM. SOC., Bd. 116, Nr. 15, 1994, Seiten 6739-6744, XP001154849 siehe Abstrakt und Conclusion	1-18

-/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Oktober 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23/10/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Grosskopf, R



## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	CORREA-DUARTE MA ET AL: "Stabilization of CdS semiconductor nanoparticles against photodegradation by a silica coating procedure" CHEMICAL PHYSICS LETTERS, Bd. 286, 17. April 1998 (1998-04-17), Seite 497-501 XP002256994 siehe das ganze Dokument ---	1-18
A	US 5 585 640 A (HUSTON ALAN L ET AL) 17. Dezember 1996 (1996-12-17) ---	
A	US 5 789 162 A (GALLOP MARK A ET AL) 4. August 1998 (1998-08-04) ---	
A	CHAN WARREN C W ET AL: "Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 13, Nr. 1, Februar 2002 (2002-02), Seiten 40-46, XP002256995 ISSN: 0958-1669 -----	

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationaler Aktenzeichen

PCT/EP 03/03163

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 2426919 A	02-01-1976	DE 2426919 A1	02-01-1976
US 5585640 A	17-12-1996	AT 210307 T	15-12-2001
		CA 2213477 A1	18-07-1996
		DE 69524458 D1	17-01-2002
		DE 69524458 T2	01-08-2002
		EP 0871900 A1	21-10-1998
		JP 11502610 T	02-03-1999
		WO 9621868 A1	18-07-1996
US 5789162 A	04-08-1998	US 6165717 A	26-12-2000
		AT 148889 T	15-02-1997
		AU 669489 B2	13-06-1996
		AU 2661992 A	27-04-1993
		CA 2118806 A1	01-04-1993
		DE 69217497 D1	27-03-1997
		DE 69217497 T2	12-06-1997
		DK 604552 T3	04-08-1997
		EP 0604552 A1	06-07-1994
		EP 0773227 A1	14-05-1997
		ES 2097925 T3	16-04-1997
		GR 3023156 T3	30-07-1997
		JP 2001524926 T	04-12-2001
		US 6143497 A	07-11-2000
		WO 9306121 A1	01-04-1993
		US 5639603 A	17-06-1997
		US 6140493 A	31-10-2000
		US 6416949 B1	09-07-2002
		US 5708153 A	13-01-1998
		US 5770358 A	23-06-1998